

Tézisek a PhD-fokozat megszerzéséhez

**A FOTOSZINTETIKUS FUNKCIÓK GÁTLÁSA ÉS
HELYREÁLLÍTÁSA FÉNNYEL**

Írta: Bernát Gábor



Témavezető: Dr. Demeter Sándor
biológiai tudományok doktora

MTA Szegedi Biológiai Központ
Növénybiológiai Intézet
Szeged 2000



Bevezetés

Autotróf élőlények a Nap által kibocsátott fényenergia segítségével CO_2 -ból és vízből szerves molekulákat szintetizálnak, ezt a folyamatot, amely voltaképpen egy bonyolult biofizikai-biokémiai eseménysor, fotoszintézisnek nevezzük. A fotoszintézis biokémiai folyamataiban kulcsszerepet játszik az ATP és a NADPH: előbbi mint átmeneti energiatároló, utóbbi pedig mint redukálószer. Mindkét vegyület képződése az ún. fotoszintetikus elektrontranszporthoz kapcsolódik, aminek hajtóereje a fény. A fotoszintetikus elektrontranszport a növényi sejtek kloroplasztiszainak tilakoid membránjába ágyazódó három nagy fehérjekomplexumon: a második fotokémiai rendszeren (PS II), a citokróm b/f komplexen, az első fotokémiai rendszeren valamint mobilis redox-aktív komponenseken keresztül zajlik.

A fény az energetikai vonatkozásokon túl más pontokon is hat a fotoszintézisre, pl. fontos szerepet játszik a növények életében mint jelforrás és szabályozó faktor. Fény szükséges a fotoszintetikus pigmentek szintéziséhez és a fotoszintetikus oxigénfejlesztést felelős katalitikus hely, a PS II lumen oldalán elhelyezkedő vízbontó rendszer működőképes összeállítódásához, a fényaktiváláshoz is. Ez a folyamat lejátszódik mind frissen szintetizálódó, mind különféle stresszhatások után regenerálódó PS II esetén. Túlzott mennyiségű fény a fotoszintetikus funkciók (reverzibilis) csökkenéséhez majd a fotoszintetikus apparátus (irreverzibilis) sérüléséhez, az ún. fénygátláshoz vezet. A fénygátlás elsődlegesen szintén a második fotokémiai rendszert érinti.

A tézisek alapjául szolgáló dolgozat a fotoszintézis-fény kapcsolat két fontos aspektusáról: a fényaktiválásról és fénygátlásról szól.

Tudományos előzmények

A fényaktiválás

A PS II vízbontó rendszerének legfontosabb része egy négymagvú Mn-centrum, amely funkcionálisan aktív formában csak fény jelenlétében tud összeállítódni. A fényaktiválásnak nevezett jelenség legjobb indikátora a fotoszintetikus oxigénkibocsátás megjelenése és növekedése a folyamat során. Az oxigénfejlődés Mn/fényfüggő aktiválódását a kísérleti objektumok széles választékán tanulmányozták: PS II-részecskéktől intakt

növényekig és algákig. A Mn-tetramér összeállításához (csakúgy mint működéséhez) Ca^{2+} - és Cl^- -ionok jelenléte is szükséges. A fényaktiválás kulcslépései két fényfüggő és egy közük ékelődő fényfüggetlen lépés. Miller és Brudvig a fényfüggő lépéseket $\text{Mn}^{2+} + h\nu \rightarrow \text{Mn}^{3+} + e^-$ oxidációnak, a közbelső fényfüggetlen lépést pedig egy Mn^{2+} ligációjának azonosította [1]. Újabb adatok szerint [2] az ún. fényfüggetlen lépés két részre bontható: egy Ca^{2+} - és egy azt követő Mn^{2+} -kötődésre.

Számos laboratórium állított már elő 2-, 3- és 4-magvú Mn-komplexeket a vízbontó rendszer modellezése céljából. A vizsgálatok során általában az előállított vegyületek és más Mn-tartalmú fehérjék mágneses paramétereit vetették össze a PS II megfelelő jeleivel és a talált hasonlóságok alapján modellezték a Mn-tetramér szerkezetét. Allakhverdiev és mtsai binukleáris Mn-komplexeket használtak fotoaktivációs kísérleteikhez [3]. Eredményeik szerint az alkalmazott két vegyület sokkal nagyobb hatékonyságot mutat az oxigénfejlődés visszaállításánál és sokkal könnyebben donál elektronokat a P680 felé, mint a MnCl_2 [3,4], amit úgy magyaráznak, hogy a vízbontáshoz mindössze 2 Mn/PS II elegendő, a fennmaradó kettő más fémionokkal is helyettesíthető. Mivel ez ellentétben áll a jelenleg elfogadott képpel, érdemesnek láttuk további polinukleáris komplexek kipróbálását fényaktiválási kísérletekben.

A fénygátlás

Noha a fény a fotoszintézis abszolút előfeltétele, - paradox módon - a növényeket érő egyik fő stresszhatás is. Két típusát különböztetjük meg: donor- ill. akceptor oldali fénygátlásról szokás beszélni attól függően, hogy az elektrontranszport primér gátlása a PS II elsődleges elektrondonorának (P680) a donor- vagy akceptor oldalán játszódik le. Akceptor oldali fénygátlás esetén a P680 több elektront pumpál az elektrontranszportláncba, mint amennyit a metabolikus folyamatok hasznosítani tudnak, ezért az akceptor oldal kiredukálódik, amit az elsődleges kinon akceptor (Q_A) teljes (kétszeres) redukciója, protonálódása és kikötődése követ. Újabb elektron ezután már csak a feofitinig juthat, a negatív töltés nem tud stabilizálódni, így a $\text{P680}^+\text{Pheo}^-$ töltérekombináció könnyen bekövetkezhet. Ennek eredményeként a P680 triplett állapotba kerül, mely forma közönséges (triplett) oxigénnel reagálva reaktív szingulett oxigént eredményez. A szingulett oxigén ezután a D1 fehérje sérülését okozza. Részben vagy teljesen inaktív vízbontó rendszer esetén pozitív töltések

halmozódhatnak fel a donor oldalon, ami szintén reaktív termékek képződéséhez és a D1 sérüléséhez vezet.

Ha a fénygátlás első lépéseit kívánjuk tanulmányozni, akkor praktikus megközelítés a jelenség anaerob körülmények közötti vizsgálata, így ugyanis a szingulett oxigén (és egyéb reaktív oxigénformák) károsító hatása nagyrészt kiküszöbölhető és az egyes elektrontranszport-komponensek látszólagos csökkenése nagyrészt a primér gátlással hozható összefüggésbe. Ezzel a megközelítéssel sikerült kimutatni a Q_A központi szerepét a PS II fény okozta sérülésénél, egyúttal cáfolni azt a korábban közkeletű nézetet, miszerint a fénygátlás elsődleges hatóhelye a másodlagos kinon akceptor üres kötőhelye [5,6].

Egymástól elkülönítve vizsgálhatók a fotoszintetikus elektrontranszportlánc komponensei elektronspin rezonancia (ESR) spektroszkópia ill. termolumineszcencia (TL) módszer segítségével. Az eredmények értelmezésénél problémát jelent, hogy a fényaktiválásban kulcsszerepet játszó Q_A -hoz mind ESR-ben ($g=1,82$ és $g=1,9$ $Fe^{2+}Q_A^-$ jelek), mind TL-ben (Q- és C-sávok) több különböző jel tartozik. A $g=1,9$ jelhez a non-hem vas bikarbonát-iont koordináló, a $g=1,82$ jelhez bikarbonát-mentes állapotát rendelik. Valójában, mivel a jel/zaj viszony javítása érdekében mindig formátot adtak a mintához, amely kiszorítja a bikarbonát-iont kötőhelyéről, csak a $g=1,82$ ESR-jel fénygátlás okozta csökkenését vizsgálták [5]. A TL-vizsgálatoknál további problémát jelent, hogy a sávok egy részénél bizonytalan, hogy milyen donor-akceptor pár tartozik hozzá. Mivel mindkét módszerrel a fotoszintetikus elektrontranszportlánc fénygátlás szempontjából fontos komponenseiről nyerhetünk információkat, ezért - a bizonytalanságok csökkentése ill. a jelenség újabb oldalról való tanulmányozása céljából - összehasonlító TL és ESR vizsgálatok végzését, továbbá a kérdéses TL-sávok ESR-mérésekkel történő azonosítását határoztuk el.

Célkitűzés

A fénygátlás és fényaktiválás tanulmányozása nagyban hozzájárult a fotoszintézis ill. azon belül a második fotokémiai rendszer és vízbontó apparátus megismeréséhez. A felmerülő új kérdések további ígéretes kutatási perspektívát nyújtanak. Munkánk kezdetén ezért három idevágó részterület tanulmányozását tűztük ki célul:

1. Összehasonlító elektronspin rezonancia és termolumineszcencia mérések segítségével a Q és C TL-sávok eredetének tisztázását. Kísérleteket végezni annak megállapítására, vajon a Q_A kinon akceptor $g=1,9$ vagy $g=1,82$ formája vesz-e részt ezen töltérekombinációkban.
2. A TL-sávok eredetének tisztázása után összehasonlító ESR- és TL-vizsgálatokkal, anaerob körülmények között tanulmányozni a fényátlás primér folyamatait. Meghatározni a többféle állapottal leírható elektrontranszport-komponensek különböző formáinak fényátlással szembeni érzékenységét.
3. Vizsgálni szintetikus Mn-komplexek elektrononálási és fényaktivási képességét. Összefüggéseket keresni a Mn-komplexek szerkezete, a komplexeket alkotó Mn-ionok száma, vegyértékállapota, a Mn-ionokkal koordinatív kötést kialakító atomok (O vagy N) milyensége és az elektrononálás/fényaktiválás hatékonysága között.

Anyagok és módszerek

Kísérleti anyagok

A tilakoid membránok és PS II részecskék izolálásához használt fiatal borsó (*Pisum sativum* L. c.v. Rajnai törpe) növényeket üvegházban neveltük, a spenót (*Spinacea oleracea* L.) leveleket piacról szereztük be. A fényaktiválás során felhasznált 13-féle Mn-komplexet külföldi partnereink állították elő a Department of Chemistry, University of Poona (India) laboratóriumaiban prof. Subhash Padhye irányításával.

Tilakoid membránok és PS II membránrészek izolálása

A megmosott borsó- v. (összedarabolt) spenótleveleket turmixgépben 10 s-ig törtünk 0,4 M NaCl / 2 mM $MgCl_2$ / 20 mM Tricin (pH 8,0) pufferben. A nyert szuszpenziót két réteg sajtruhán átszűrtük és 1000 g értéken egy percig centrifugáltuk. Az üledéket kidobtuk, a felülúszót 7 percig centrifugáltuk 3000 g-n. Az így kapott pelletet 150 mM NaCl / 5 mM $MgCl_2$ / 20 mM Tricin (pH 8,0) pufferben felszuszpendáltuk, amit újabb 7 perces 3000 g-n végzett centrifugálás követett. Az üledéket végül 0,4 M szacharóz / 15 mM NaCl / 5 mM

MgCl₂ / 20 mM MES (pH 6,5) pufferben (= A oldat) szuszpendáltuk. Az A oldatban szuszpendált tilakoid membránokat Triton X-100 jelenlétében (Triton/Chl = 25:1 w/w; [Chl] = 2 mg/ml) 30 percig inkubáltuk 0°C-on. A gránum régió membránjait 40 000 g-s 30 percig tartó centrifugálással ülepítettük. A méréseket zavaró keményítő-szennyeződéstől 8000 g-s centrifugálással szabadultunk meg, majd a felülúszót továbbvíve ismét egy 40 000 g-s ülepítés következett. A mintákat -80°C-on tároltuk a felhasználásig.

Mn-kivonás és fényaktiválás

A PS II membrándarabok Mn-mentesítése 30 perces 5 mM hidroxil-amin (a szuszpendáló pufferben feloldva) inkubációval történt 0,5 mg/ml Chl-koncentráció mellett sötétben, jégben. A mintákat ezután lecentrifugáltuk, kétszer mostuk és az A oldatban szuszpendáltuk. A Mn-mentes PS II-részecskéket 100 µM MnCl₂-dal ill. ekvivalens mennyiségű Mn-kompleksszel fényaktiváltuk 0,4 M szacharóz / 110 mM NaCl / 20 mM CaCl₂ / 20 mM MES (pH 6,5) pufferben, 10 µM DPIP jelenlétében. A fényaktiválás 20 egymást követő 20 s időtartamú vörös, gyenge fényű megvilágítással (Walz 102L) történt szobahőmérsékleten, 20 s-os (sötét) szünetekkel, 0,125 mg/ml Chl-koncentráció mellett. Anyagainkat ezután lecentrifugáltuk, kétszer mostuk és az A oldatban szuszpendáltuk.

Fénygátlás

A fénygátlás-kísérleteknél alkalmazott anaerob körülményeket úgy értük el, hogy az előállított PS II preparátumokat - hígítás nélkül - ESR-csőbe töltöttük és 2 órán keresztül szobahőmérsékleten sötétben állni hagytuk. Megfigyeléseink szerint ezek a nagy töménységű minták - ismeretlen módon - spontán oxigénmentessé válnak, így semmilyen további kémiai adalékra nincs szükség. A minták fénygátlását különböző ideig tartó, szobahőmérsékleten végrehajtott, 800 W/m² intenzitású, ESR-csőben végzett megvilágítással értük el. A fénygátlás által indukált, méréseket zavaró átmeneti változásokat 2 h időtartamú sötét-adaptálással küszöböltük ki.

Biofizikai módszerek

Az oxigénfejlődés sebességét Clark-elektóddal (Hansatech) mértük szobahőmérsékleten, telítési fehér fényen, 30 $\mu\text{g/ml}$ Chl-koncentrációnál, exogén elektronakceptorok jelenlétében. A flash-indukált oxigénfejlődés mértékét egy saját készítésű Joliot-típusú elektóddal mértük. 100 μl mintát az elektód felületére rétegeztünk és öt perc sötétadaptálás után rövid fényimpulzusokkal világítottunk meg, miközben mértük a felszabaduló oxigén mennyiségét.

A fluoreszcencia indukciót PAM (Walz) spektrofluoriméterrel mértük. 10 $\mu\text{g/ml}$ Chl-koncentrációjú mintát modulált vörös vagy fehér fénnel világítottunk meg és mértük a kibocsátott fluoreszcens fény intenzitását. Elektrodonálási kísérleteinknél 10-1000 μM MnCl_2 ill. ekvivalens mennyiségű komplex hozzáadása után mértük a fluoreszcencia felfutását. A mérések vezérlése, a fluoreszcencia tranziensek kiértékelése egy erre a célra kifejlesztett gyári szoftverrel (FIP) történt.

A termolumineszcencia méréseket házi építésű berendezésekkel végeztük. A mintákat 10 W/m^2 intenzitású fehér fénnel világítottunk meg 30 s-ig alacsony (-40° v. -80°C) hőmérsékleten. Megvilágítás után a mintákat 20°C/min sebességgel $+80^\circ\text{C}$ -ig melegítettük miközben a hőmérséklet függvényében kibocsátott termolumineszcencia-fény intenzitását fotoelektron-sokszorozóval (EMI 9558 A vagy Hamamatsu R 2228) mértük. A Q- és C-sáv lecsengésének mérésekor a fűtést -25°C ill. $+25^\circ\text{C}$ -on különböző ideig megállítottuk, majd a spektrumokat továbbmérve mérési pontonként határoztuk meg az adott sávhoz és hőmérséklethez tartozó kinetikát.

Az ESR-méréseket Bruker ER 200 D-SCR ill. JEOL RE1X típusú spektrométerekkel végeztük. Az alacsony hőmérsékletű mérések a spektrométer mágnespólyái között elhelyezkedő Oxford ESR 9 kriosztátban történtek. Az 5-8 mg/ml Chl-koncentrációjú minták gerjesztése aceton/folyékony nitrogén fürdőben, vagy folyékony nitrogénben történt, 1000 W/m^2 intenzitású fehér fény alkalmazásával.

Tudományos eredmények összefoglalása

Vizsgálataink a fénygátlásnak és fényakiválásnak, a fotoszintézis két egymást kiegészítő folyamatának a jobb megértéséhez szolgáltatattak újabb adatokat, egyúttal értékes információkat nyújtottak a PS II heterogenitásról és a vízbontó rendszer szerkezetéről is. Munkánk során a következő fő eredményeket értük el:

(1) Megállapítottuk a C TL-sáv eredetét ($Y_D^+Q_A^-$ töltésrekombináció) és újabb oldalról vizsgáltuk a Q TL-sávot okozó $S_2Q_A^-$ töltésrekombinációt. Kimutattuk, hogy a két sáv kialakításában a Q_A kétféle formája vesz részt. Adatokat nyertünk arra nézve, hogy akceptor-oldali hatások jelentős változásokat indukálhatnak a PS II donor oldalán.

(2) Megállapítottuk, hogy az elsődleges kinon akceptor kétféle formájához eltérő fénystressz-érzékenység tartozik. Megfigyeltük, hogy a Q_A ($g=1,9$) gátlódásával azonos ütemben gátlódik a vízbontó rendszer és a citokróm b_{559} magas potenciálú formája, a Q_A ($g=1,82$) fénygátlás okozta csökkenése pedig az Y_D^+ és az alacsony potenciálú Cyt b_{559} változásával azonos lefutást mutat. Kimutattuk, hogy a kétféle Q_A a PS II-populáció két típusát reprezentálja.

(3) Kimutattuk a bikarbonát-ion fénygátlás elleni védekezésben játszott szerepét és magyarázattal szolgáltunk a PS II kétféle típusának eltérő fényérzékenységére.

(4) A jelenségcsoport másik oldalára vonatkozóan megállapítottuk, hogy igen szoros korreláció van a különböző mangántartalmú komplexek elektrontranszferenciái és oxigénfejlesztést helyreállító képessége között.

(5) Megállapítottuk, hogy a nagyméretű ligandumok nem akadályai a fényaktiválásnak. A komplex mangán-vegyületek részleges vagy teljes beépülése a PS II donor oldalának flexibilitását mutatja.

(6) Kimutattuk, hogy a különböző Mn-komplexek fényaktiválásban mutatott hatásossága függ a komplexet alkotó Mn-ionok számától, vegyértékállapotától, a komplex szerkezetétől, a donor-atomok milyenségétől és számától.

(7) Bizonyos vegyületekkel végrehajtott fényaktiválás után rendellenes "flash"-oxigén mintázatot figyeltünk meg, melyet a létrejött vízbontó rendszer természetestől eltérő sajátságaival hoztunk összefüggésbe.

(8) Adatokat nyertünk arra vonatkozóan, hogy a vízbontás működéséhez a vízbontó rendszer mind a négy mangánjának a kooperációja szükséges.

Irodalmi hivatkozások

- [1] Miller A-F & Brudvig GW (1990) *Biochemistry* 29, 1385-1392
- [2] Ananyev GM, Zaltsman L, McInturff RA & Dismukes GC (1998) in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (Garab G ed) Vol. II. pp 1347-1350, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- [3] Allakhverdiev SI, Karacan MS, Somer G, Karacan N, Khan EM, Rane MY, Padhye S, Klimov VV & Renger G (1994) *Biochemistry* 33, 12210-12214
- [4] Allakhverdiev SI, Karacan MS, Somer G, Karacan N, Khan EM, Rane MY, Padhye S, Klimov VV & Renger G (1994) *Z. Naturforsch.* 49c, 587-592
- [5] Stryring S, Virgin I, Ehrenberg A & Andersson B (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1015, 269-278
- [6] Vass I, Stryring S, Hundal T, Koivuniemi A, Aro E-M & Andersson B (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1408-1412

Az értekezésben felhasznált és kapcsolódó közlemények

Az értekezésben felhasznált közlemények:

Demeter S, Goussias Ch, Bernát G, Kovács L & Petrouleas V (1993) Participation of the $g = 1.9$ and $g = 1.82$ EPR forms of the semiquinone-iron complex, $Q_A^{\cdot-}Fe^{2+}$ of photosystem II in the generation of the Q and C thermoluminescence bands, respectively. *FEBS Lett.* 336, 352-356

Demeter S, Nugent JHA, Kovács L, Bernát G & Evans MCW (1995) Differential sensitivity of the photosystem II reaction centers against photoinhibition under anoxic conditions. *Photosynth. Res.* 46, 213-218

Bernát G, Padhye S & Demeter S (1996) Chemical probes for water-oxidation: synthetic tetranuclear manganese complexes in photoactivation of water oxidizing complex and as exogen electron donors to photosystem II. *B. Soc. Roy. Sci. Liège* 65, 352

Bernát G, Padhye S, Barta Cs, Kovács L & Demeter S: Chemical Probes for Water-Oxidation: Synthetic Manganese Complexes in Photoactivation of Water Oxidizing Complex and as Exogenous Electron Donors to Photosystem II. Submitted to Z. Naturforsch.

Kapcsolódó közlemények:

Labádi I, Bernát G, Párkányi L, Kenessey G & Liptay Gy (1992) Preparation and characterization of parent and mixed-ligand complexes in 1,2-ethanediol-water-zinc sulphate systems. X-ray crystal structure of $\text{Zn}(1,2\text{-ethanediol})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{SO}_4)$. Polyhedron 11, 2975-2981

Kovács L, Hegde U, Padhye S, Bernát G & Demeter S (1996) Effects of potassium-(picrate)-(18-crown-6) on the photosynthetic electron transport. Z. Naturforsch. 51c, 539-547

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok dr. Dudits Dénes akadémikusnak, amiért lehetővé tette, hogy a disszertáció alapjául szolgáló munkát az MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézetében elvégezhessem.

Külön köszönettel tartozom dr. Demeter Sándor tudományos tanácsadónak, a Fotoszintézis Bioenergetikája Csoport vezetőjének, iránymutatásaiért, szakmai segítségéért és emberi hozzáállásáért.

Köszönetemet fejezem ki valamennyi kollégámnak, akikkel az elmúlt évek során együtt dolgozhattam.

Végül, de nem utolsósorban, hálámat fejezem ki családtagjaimnak, akik odaadó támogatása nélkül ez a disszertáció nem jöhetett volna létre.